



DEUTSCHES

PATENTAMT

Offenlegungsschrift

11 DE 3347548 A1

51 Int. Cl. 4:

G 01 N 33/58

G 01 N 33/60

G 01 N 33/68

G 01 N 33/74

21 Aktenzeichen: P 33 47 548.2

22 Anmeldetag: 30. 12. 83

43 Offenlegungstag: 11. 7. 85

DE 3347548 A1

71 Anmelder:

Jüppner, Harald Werner, Dr.med., 3000 Hannover,  
DE; Hesch, Rolf Dieter, Prof.Dr., 3004 Isernhagen, DE

74 Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,  
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,  
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 5000 Köln

72 Erfinder:

gleich Anmelder

54 Mittel und Verfahren zur spezifischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84

Ein neues Mittel und Verfahren zur spezifischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84 neben intaktem Parathormon 1-84 sowie den längeren Parathormonfragmenten 43-84 und 53-84 wird beschrieben, unter Verwendung eines neuen hochspezifischen Antikörpers, der herstellbar ist durch Applikation des Kondensationsproduktes aus einem synthetischen C-terminalen Parathormonfragment 68-84 bis 72-84 an Fremdeiweiß.

DE 3347548 A1

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Mittel zur spezifischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragmentes 68-84 bei geringer Kreuzreaktivität für intaktes Parathormon 1-84 sowie den längeren Parathormonfragmenten 43-84 über die C-terminale Erkennungsregion, enthaltend einen Antikörper und ein markiertes C-terminales Parathormonfragment, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper hergestellt wurde unter Verwendung des Kondensationsproduktes aus einem synthetischen C-terminalen Parathormonfragment 68-84 bis 72-84 an Fremdeiweiß.
2. Mittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als C-terminales Parathormonfragment synthetisches 70-84 Fragment verwendet wird, welches mittels Carbodiimid an Serumalbumin kondensiert ist.
3. Mittel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als markiertes C-terminales Parathormonfragment tyronisiertes radioaktiv markiertes 70-84-Fragment verwendet wird.
4. Verfahren zur spezifischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84 bei geringer Kreuzreaktivität für intaktes Parathormon 1-84 sowie den längeren Parathormonfragmenten 43-84 über die C-terminale Erkennungsregion unter Verwendung eines Antikörpers und eines markierten C-terminalen Parathormonfragments, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper verwendet wird, der herstellbar ist durch Applikation des Kondensationsproduktes aus einem synthetischen C-termi-

nen Parathormonfragment 68-84 bis 72-84 an Fremdeiweiß.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als C-terminales Parathormonfragment synthetisches 70-84-Fragment verwendet wird, welches mittels Carbodiimid an Serumalbumin kondensiert ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß als markiertes C-terminales Parathormonfragment tyronisiertes radioaktiv markiertes 70-84-Fragment verwendet wird.

VON KREISLER    SCHÖNWALD    EISHOLD    FUES  
VON KREISLER    KELLER    SELTING    WERNER

.3.

Dr. med. Harald Werner Jüppner  
Schleiermacherstr. 28

3000 Hannover 61

Prof. Dr. Rolf-Dieter Hesch  
Gartenweg 12

3004 Isernhagen 2

## PATENTANWÄLTE

Dr.-Ing. von Kreisler † 1973  
Dr.-Ing. K. W. Eishold † 1981  
Dr.-Ing. K. Schönwald  
Dr. J. F. Fues  
Dipl.-Chem. Alek von Kreisler  
Dipl.-Chem. Carola Keller  
Dipl.-Ing. G. Selting  
Dr. H.-K. Werner

DEICHMANNHAUS AM HAUPTBAHNHOF  
D-5000 KÖLN 1

29. Dezember 1983  
W/hg/Lö-1008

Mittel und Verfahren zur spezifischen immunologischen

Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Mittel und Verfahren zur spezifischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84, bei geringer Kreuzreaktivität für intaktes Parathormon 1-84 sowie den längeren Parathormonfragmenten 43-84 über die C-terminale Erkennungsregion. Zu einer solchen Bestimmung benötigt man einerseits einen spezifischen Antikörper und zum anderen ein ausreichend empfindlich markiertes C-terminales Parathormonfragment.

Humanes Parathormon (hPTH) ist ein aus 84 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches in den Nebenschilddrüsen synthetisiert wird. Vorstufen des intakten 1-84 PTH, das Prä-Pro-PTH und das Pro-PTH werden in den Zellen der Nebenschilddrüsen enzymatisch degradiert. In die Blutzirkulation gelangt daher lediglich das 1-84 PTH. Dieses wird durch weitere enzymatische Abbauvorgänge in mehreren Organen in unterschiedlich lange PTH-Fragmente degradiert. Einige dieser Fragmente entfalten offensichtlich biologische Aktivitäten an Knochen- und Nierenzellen. Auch in der Leber und den Nieren entstehen aus dem 1-84 PTH sogenannte N-terminale PTH-Fragmente, d.h. Peptide mit einer Aminosäuresequenz von 1-34, 1-36, 1-37 und 1-43. Verschiedene Autoren schreiben diesen Fragmenten die alleinige biologische Wirkung an Knochenzellen zu. Andere Autoren behaupten hingegen, daß sowohl das N-terminale Fragment als auch das intakte PTH biologisch wirksam sind.

Durch die Abspaltung des N-terminalen Fragmentes, d.h. der Aminosäuren 1-34 bis 1-43 verbleibt ein größeres C-terminales PTH-Peptid der Sequenz von ca. 43-84, das sogenannte Mitt-C-regionale PTH. Es bestehen Hinweise darauf, daß auch diese Fragmente enzymatisch weiter abgebaut werden und daß auch diesen Fragmenten eine

biologische Rolle zuzuschreiben ist. Insbesondere scheinen sie regulierend in den Knochen- und damit in den Kalziumstoffwechsel einzugreifen. Es besteht somit ein wissenschaftliches und medizinisch-diagnostisches  
5 Interesse daran, diese Fragmente qualitativ und quantitativ messend zu verfolgen.

Es sind bereits Radioimmunoassays (RIA) bekannt, welche selektiv Mitt-C-regionales PTH erfassen. Sie haben sich in der Routinediagnostik des primären (extrarenalen)  
10 Hyperparathyreodismus und des renalen Hyperparathyreodismus (HPT) bewährt. Die Antikörper hierfür werden hergestellt durch Kondensation synthetischer Mitt-regionaler Parathormonfragmente an Fremdeiweiß. Diese Antikörper sind jedoch nicht in der Lage, das ebenfalls  
15 interessierende Fragment 68-84 selektiv, d.h. ausschließlich zu erfassen.

Versuche, das C-terminale PTH-Peptid selektiv mit einem RIA zu erfassen, sind bisher völlig gescheitert. Antisera, die gegen synthetisches oder extraktives 53-84  
20 hPTH oder 53-84 bPTH produziert wurden, zeigten keine ausgesprochende Selektivität für speziell die C-terminale Aminosäuresequenz; d.h. 75-84. Erfasst wurden vielmehr durch diese Methoden die gleichen Mitt-C-regionalen PTH-Peptide der Sequenz ca. 43-84, welche auch  
25 von den oben erwähnten bisher bekannten RIAs gemessen wurden. Offensichtlich liegen die solche Antikörper spezifisch ausbildenden immunologisch relevanten Gruppen auch in den Sequenzbereichen der Aminosäuren 45-67, so daß sie Fragmente der Sequenzen 68-84 nicht miterfassen können.  
30

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, ein Mittel und ein Verfahren zur spezifischen immunologischen Be-

stimmung des C-terminalen Parathormonfragments 68-84 zu entwickeln, mit welchem speziell dieses Fragment erfaßt werden kann und die Kreuzreaktion zu intakten PTH und den Fragmenten 43-84 gering ist und das Fragment 53-84  
5 nur über seine C-terminalen Anteil miterfaßt wird.

Es war zu erwarten, daß ein Kondensationsprodukt aus einem C-terminalen Parathormonfragment 68-84 bis 72-84 an Fremdeiweiß entweder keinen oder nur einen sehr unspezifischen Antikörper bilden würde, welcher neben dem  
10 Fragment 68-84 auch die längeren Fragmente 53-84, 43-84 und intaktes Parathormon obendrein über die extrem C-terminalen Erkennungsregionen erfassen würde. Überraschenderweise hat sich jedoch gezeigt, daß ein derartiges Kondensationsprodukt in der Lage ist, einen Anti-  
15 körper zu bilden, der hochspezifisch das Fragment 68-84 erfaßt. Je länger die Sequenzen werden, die nur über diese extrem C-terminalen Erkennungsregionen erkannt werden, desto geringer ist ihre Kreuzreaktivität. Überraschenderweise wird humanes PTH Fragment 53-84 gut  
20 erkannt während bovines PTH Fragment 53-84 nicht erfaßt wird, da es an drei Positionen modifiziert ist (Aminosäuren 64, 79 und 83). Hieraus ist zu schließen, daß die Erkennungsregionen im Bereich der Aminosäuresequenz 75-84 liegt.

25 Der neue und hochspezifische Antikörper ist somit in der Lage, das interessante Fragment 68-84 direkt zu erfassen, so daß man nicht auf die stets sehr ungenauen Differenzmessungen aus der Summe aller Fragmente und des intakten Parathormons abzüglich der Werte angewiesen ist, die für intaktes Parathormon und Mitt-C-regionales PTH ermittelt wurden.  
30

Die Aufgabe wird somit durch ein Mittel gelöst, welches

dadurch gekennzeichnet ist, daß der Antikörper hergestellt wurde unter Verwendung des Kondensationsproduktes aus einem synthetischen C-terminalen Parathormonfragment 68-84 bis 72-84 an Fremdeiweiß.

- 5 Vorzugsweise wird als C-terminales Parathormonfragment synthetisches 70-84-Fragment verwendet. Dieses läßt sich in an sich bekannter Weise mittels Carbodiimid an Serumalbumin kondensieren und zur Herstellung von Antikörper verwenden. Ein derartiges Antikörper enthaltendes
- 10 Serum wird beispielsweise dadurch hergestellt, daß man ein derartiges Kondensationsprodukt von Rinderserumalbumin (BSA) beim Schaf appliziert. Zur verstärkten Antikörperbildung kann komplettes Freundsches Adjuvanz zugegeben werden. Die Applikation erfolgt vorzugsweise
- 15 intracutan in der Nackenmuskulatur. Bereits nach zweimaligem Wiederholen dieser Injektionen wurden die neuen und hochspezifischen Antikörper gegen das jeweils verwendete synthetische Fragment aber auch gegen das natürlich vorkommende Fragment 68-84 gefunden.
- 20 Die immunologische Bestimmung erfolgt in an sich bekannter Weise unter Verwendung eines entsprechend markierten C-terminalen Parathormonfragments. Für einen Radioimmunoassay (RIA) kann beispielsweise das synthetische Fragment tyronisiert und mit radioaktivem Jod
- 25 markiert werden. Prinzipiell sind aber auch andere Markierungen wie die Bindung an ein Enzym, ein Enzymsubstrat, eine fluoreszierende Gruppe etc. möglich. Entscheidend ist alleine, daß die für die Erkennung durch den Antikörper entscheidende Gruppe 74-84 vorhanden und
- 30 zugänglich ist.

Die für die Herstellung des Antikörpers notwendigen 68-84 bis 72-84 Parathormonfragmente werden in an sich



bekannter Weise hergestellt, beispielsweise indem man in einem Peptidsyntheseautomaten schrittweise auf einem chlormethylierten Harz die Peptidsequenz 68-84 bis 72-84 des humanen Parathormons aufbaut, anschließend mit wasserfreier HF in Gegenwart von Anisol vom Trägerharz sowie den mitgeführten Schutzgruppen abspaltet und durch Extraktion und Chromatographie reinigt.

Die Kopplung der Peptidbausteine wird vorzugsweise mit folgenden Reagenzien und Reaktionsschritten durchgeführt:

- |    |     |  |         |          |
|----|-----|--|---------|----------|
|    | 1.  | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   | waschen | (2 mal)  |
|    | 2.  | MeOH   | waschen | (2 mal)  |
|    | 3.  | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   | waschen | (3 mal)  |
|    | 4.  | 50 % TFA + 5 % 1,2 Ethandithiol in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$                                |         |          |
| 15 | 5.  | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   | waschen | (2 mal)  |
|    | 6.  | MeOH   | waschen | (1 mal)  |
|    | 7.  | $\text{Et}_3\text{N}$ 10 % in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 5 % DMF                           |         |          |
|    | 8.  | MeOH   | waschen | (1 mal)  |
|    | 9.  | $\text{Et}_3\text{N}$ 10 % in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + 5 % DMF                           |         |          |
| 20 | 10. | MeOH   | waschen | (1 mal)  |
|    | 11. | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   | waschen | (2 mal)  |
|    | 12. | Benzyloxycarbonyl-Aminosäure (2 = mmol) in 40 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ + DCCI (20 mmol) |         |          |
|    |     |  |         | (1 mal). |

25 Zur Ankopplung des jeweils nächsten Peptidbausteins wird diese Reaktionsfolge wiederholt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysine mit der 2-Chlorobenzyloxycarbonylgruppe, von Asparagin und Glutamin mit der Xanthylgruppe geschützt. Die Guanidingruppe von Arginin und die Imidazolgruppe von Histidin wird mit der Tosyl-

gruppe geschützt, und die  $\beta$ -Carboxylgruppe von Aspar-  
tinsäure, die  $\gamma$ -Carboxylgruppe von Glutaminsäure sowie  
die Hydroxylgruppe von Serin wird mit der Benzylgruppe  
geschützt.

- 5 Die Extraktion erfolgt durch wäßrige Essigsäure, dann  
Filtrieren über Sephadex G-25 mit 1 molarer Essigsäure,  
Lyophilisieren und Chromatographieren mit Ammoniumace-  
tat-Acetonitril als Elutionsmittel unter Hochdruck.

- 10 Das reine Material wird über Sephadex G-10 mit 1 mo-  
larer Essigsäure entsalzt, das so erhaltene Produkt  
durch Dünnschicht-Chromatographie in verschiedenen Puf-  
fersystemen untersucht und als homogen befunden. Die  
Aminosäurenanalyse und Sequenzanalyse zeigt das rich-  
tige Aminosäureverhältnis. Durch Umkehrphasen HPLC wird  
15 gefunden, daß das so erhaltene Produkt zu 98 % rein  
ist.

- Bereits die ersten Untersuchungen von Humanseren mit  
einem erfindungsgemäßen Radioimmunoassay haben gezeigt,  
daß bei Patienten mit primärem (extrarenalen) Hyperpa-  
20 rathyreodismus und mit renalem HPT im Normbereich des  
Fragmentes 68-84 liegen. Patienten mit schwerer cholest-  
tischer Lebererkrankung hingegen zeigen zum Teil  
stark erhöhte Plasmakonzentration des gesuchten PTH-  
Fragmentes. Bei Patienten mit Nierensteinleiden sind  
25 hingegen erniedrigte Werte gemessen worden.

- Das erfindungsgemäße Mittel und Verfahren zur spezi-  
fischen immunologischen Bestimmung des C-terminalen  
Parathormonfragmentes 68-84 ist somit erstmals in der  
Lage, das "wahre" C-terminale PTH-Fragment zu erfassen.  
30 Die Tatsache, daß erhöhte Konzentrationen nur bei Pati-  
enten mit schwerer Lebererkrankung gemessen werden

5 konnten, zeigt, daß die Leber eine wichtige Rolle im PTH-Stoffwechsel und somit auch im Kalziumstoffwechsel einnimmt. Erfindungsgemäß ist es somit erstmals möglich, die biologische und pathophysiologische Bedeutung dieses PTH-Fragmentes zu untersuchen.

In dem nachfolgenden Beispiel ist eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mittels und Verfahrens näher erläutert:

#### Beispiel

10 Synthetisches humanes PTH-Fragment 70-84, hergestellt nach der oben beschriebenen Methode und einem Reinheitsgrad von 98 % wird mit Hilfe von Carbodiimid an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppelt, mit komplettem Freundschem Adjuvanz emulgiert und anschließend einem Schaf an mehreren Stellen im Bereich der Nackenmuskulatur intracutan appliziert. Nach zweimaligem Wiederholen dieser Injektion von BSA-gekoppelten 70-84 hPTH wurden Blutproben des Schafes gewonnen. Das daraus gewonnene Serum enthält einen hochspezifischen Antikörper gegen die PTH-Sequenz 70-84, jedoch auch gegen die  
15 Fragmente 65-84, 68-84 und 72-84. Das Serum reagiert nur über die oben erwähnte Erkennungsregion mit synthetischen Fragmenten 53-84, 43-84 oder intaktem hPTH.

25 Das gleiche synthetische Fragment 70-84 PTH wird tyronisiert und mit radioaktivem Jod markiert. Als Standard für den Radioimmunoassay wird natives 70-84 hPTH verwendet. Untersuchungen verschiedener Seren mit verschiedenen Fragmenten zeigen, daß das Antiserum selektiv die C-terminale Sequenz des humanen PTH erfaßt, länger-kettige Fragmente und intaktes Parathormon jedoch  
30 nicht reagieren. Es besteht somit keine Kreuzreaktivität mit Mitt-C-regionalem humanem PTH.